

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19570006

研究課題名 (和文) 枯草菌 rRNA 遺伝子の遺伝解析系の構築とその利用

研究課題名 (英文) Development of genetic system of rRNA genes and its use in *B. subtilis*

研究代表者

河村 富士夫 (KAWAMURA FUJIO)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：10126039

研究成果の概要 (和文)：枯草菌の 10 個の rRNA オペロンを欠失して構築した単一 rRNA オペロン保有株は、すべて増殖と孢子形成が著しく低下しており、正常な細胞増殖と孢子形成には複数コピー以上の rRNA オペロンが必須であることが明らかになった。さらに、1 コピーから野生株の 10 コピーまで持つすべての株を構築し、孢子形成能を調べたところ、5 コピー以上の rRNA オペロンを持つ欠失株で正常に孢子形成が行われることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：We deleted the 10 *rrn* operons of *B. subtilis* sequentially, and constructed seven mutants, each harboring a single *rrn* operon in their genome. The growth rates and sporulation frequencies of these mutants were reduced drastically as compared with those of the wild type strain, indicating that normal growth as well as sporulation requires multiple copy numbers of rRNA operon. Further analysis using mutants having various numbers of rRNA operon showed that normal sporulation requires more than 5 copies of rRNA operon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,120,000	4,520,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：リボソーム、rRNA、翻訳、枯草菌、孢子形成

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性細菌の一種である枯草菌は、栄養源の枯渇など環境条件の悪化に対応して、種々の物理的・化学的的刺激に抵抗性で、生化学的にも不活性な休眠孢子を形成する。この孢子形成 (細胞分化) 過程における遺伝子発

現について、転写段階における制御機構に着目した研究はこれまで盛んに行われてきたが、翻訳段階における制御機構に関する研究はあまり行われていない。とりわけ、翻訳制御を司るタンパク質合成装置であるリボソームについては、タンパク質の新規合成に関

する詳細な生化学的解析がある一方で、細胞内においてリボソームそのものが種々の生育環境条件に呼応して質的・量的にどのように制御されているのか、等に関する知見は少ない。こうした背景から、環境変動に対するリボソームの適応進化、ならびに細胞分化過程におけるリボソームの役割について解明することを目的とし、リボソームを構成するリボソーム RNA (rRNA)、および個々のリボソームタンパク質に着目して分子遺伝生化学的解析を行うこととした。

2. 研究の目的

- (1) *rrnA*, *rrnB*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnI*, *rrnJ*, *rrnO* の 7 つの rRNA オペロンをそれぞれ 1 つずつ持つ枯草菌を作成する。
- (2) 単一 rRNA オペロンを持つ枯草菌の細胞増殖速度と孢子形成能を求める。
- (3) 正常な孢子形成に必要な rRNA オペロンのコピー数を決定する。
- (4) 単一 rRNA 保有株を用いて薬剤耐性を示す点突然変異や欠失変異の単離を試み、それらの変異とその性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) rRNA オペロン多重欠失変異株の作成

まず、各 rRNA オペロンをクロラムフェニコール耐性の *cat* 遺伝子等と置換することにより欠失変異株を作成した。次に、pCHE11 を用いた遺伝子変換を利用して薬剤耐性遺伝子を除去した。このような方法を順次行い最終的に、7 株の単一 rRNA オペロン保有株を構築した。

(2) 孢子形成率の測定

各枯草菌を 2xSG と呼ばれる孢子形成培地で 37°C 24 時間培養後、生菌数と 80°C 10 分間熱処理後の生菌数 (孢子数) を求め、孢子形成率を求めた。

(3) ショ糖密度勾配超遠心法によるリボソームの解析

各枯草菌を LB 液体培地を用いて 37°C で対数増殖期の初期 ($OD_{600} = 0.2$) まで培養し、集菌後直ぐに液体窒素で凍結して実験に使用するまで -80°C で保存した。菌体はフレンチプレスで破壊後、未破壊の細胞と細胞残渣は高速遠心で除去し、その上澄を粗抽出液とした。粗抽出液の一定量を 10-20% ショ糖密度勾配で 4°C 65,000xg で 17.5 時間遠心してリボソームのパターンを解析した。

4. 研究成果

(1) 枯草菌ゲノムには 10 種のリボソーム RNA オペロン (*rrnA*, *rrnB*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH*, *rrnI*, *rrnJ*, *rrnW*, *rrnO*) が存在している (図 1)。そのうち、*rrnI-rrnH-rrnG*、ならびに *rrnJ-rrnW* は、この記載順にゲノム

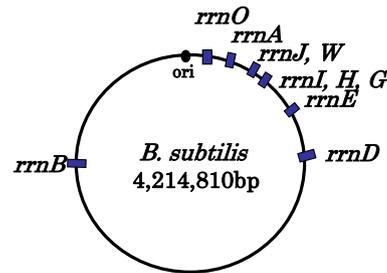


図 1. 枯草菌染色体上の rRNA オペロンの位置

上でクラスターを形成している。rRNA はリボソームが数十種のリボソームタンパク質と巨大な複合体を形成する際にその骨格として機能し、さらに近年、タンパク質合成過程における酵素反応機能も有することが明らかにされている。一般に高等真核生物の rRNA オペロンは数百コピー存在し、その各 rRNA オペロンの解析を行うことは極めて困難である。そこで、rRNA オペロンが 10 コピーと比較的少なく、細胞分化 (孢子形成) の制御機構が分子レベルで明らかにされている枯草菌を用いて、各々の rRNA オペロンの機能分化を明らかにすることを考えるに至り、まず rRNA オペロンの多重欠失変異株を作成することから開始した。トータルで 5 年がかりで 7 種の単一 rRNA オペロン保有株の作成することができた (図 2)。

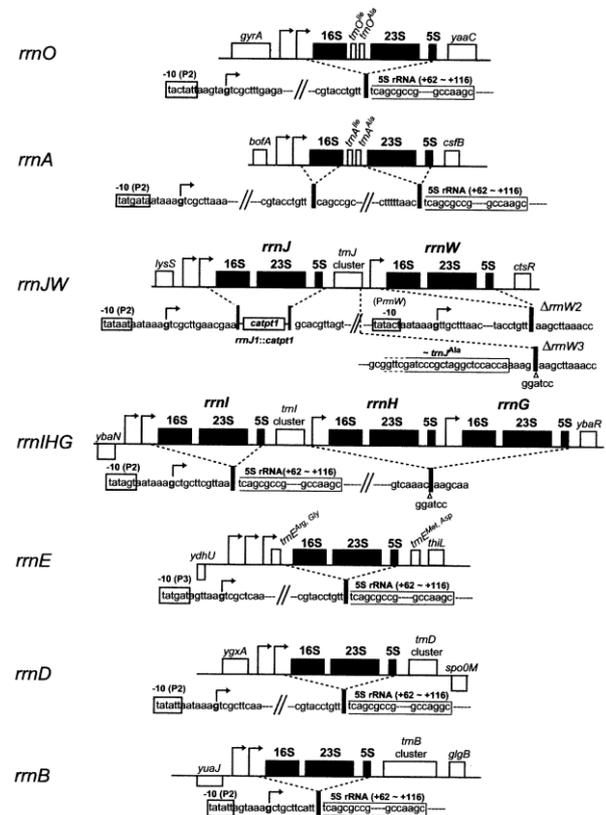


図 2. 7 種の単一 *rrn* オペロン保有変異株

(2) これら単一 rRNA オペロン保有株はすべて野生株よりも程度の差はあるが増殖速度が低下していた。その増殖速度は、野生株 $\gg rrnA^+$, $rrnJ^+$, $rrnE^+$, $rrnI^+$, $rrnO^+$ $> rrnB^+$, $rrnD^+$ の順に低下していた。同様に、孢子形成率もこれらの単一 rRNA 保有株では野生株に比べ著しく低下していた (表 1)。

Strain	CFU \cdot ml $^{-1}$		Frequency (%)
	Total	Spores	
168 (wild type)	1.1×10^9	8.1×10^8	75.5
RIK543 ($rrnO^+$)	5.4×10^8	7.9×10^4	0.015
RIK539 ($rrnA^+$)	5.6×10^8	5.5×10^3	0.001
RIK551 ($rrnJ^+$)	1.1×10^9	1.4×10^4	0.0013
RIK542 ($rrnI^+$)	2.7×10^8	7.0×10^2	0.00026
RIK545 ($rrnE^+$)	5.6×10^8	1.5×10^6	0.27
RIK541 ($rrnD^+$)	3.2×10^8	$<2.0 \times 10$	<0.00001
RIK540 ($rrnB^+$)	3.3×10^8	4.8×10^2	0.00015

表 1. 単一 rRNA オペロン保有株の孢子形成

孢子形成率も各 rrn オペロンにより大きく異なっていた。特に $rrnD^+$ と $rrnB^+$ 株では殆ど孢子形成が認められなかった。このことはすべての rrn オペロンが機能的に等価ではなく、機能的に異なる rrn オペロンに進化したことを示唆している。

(3) 次に単一 rRNA オペロンを持つ変異株の対数増殖期の細胞から粗抽出液を調製し、10%-40%ショ糖密度勾配超遠心法でリボソームのプロファイルを求めた。その結果、すべての単一 rRNA オペロン保有株の細胞は、野生株の細胞より少ないリボソームを合成していること、さらにその合成量は各々の rRNA オペロンにより異なっていることが明らかになった。これらの細胞におけるリボソーム量は、合成される rRNA 量に依存しているものと考えられるが、今後明らかにしなければならない問題である。

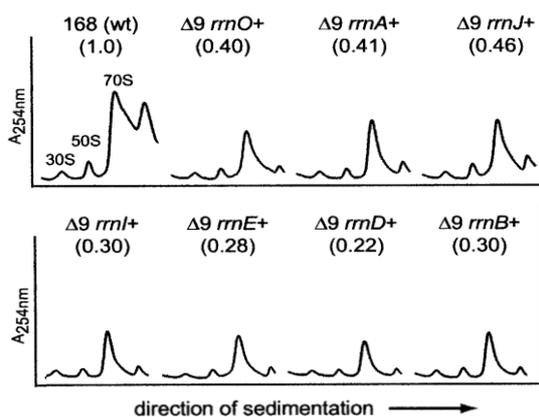


図 3. 単一 rRNA オペロンを持つ変異株におけるリボソームのプロファイル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Nanamiya, H. and Kawamura F. Towards an elucidation of the roles of the ribosome during different growth phases in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 451-461 (2010).
- ② Shimotohno, W. K., Kawamura F., Natori, H., Nanamiya, H., Magae, J., Ogata, H., Endo, T., Suzuki, T., and Yamaki, H. Inhibition of Septation in *Bacillus subtilis* by a peptide antibiotic, edein B₁. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 568-571 (2010).
- ③ Natori, Y., Tagami, K., Murakami, K., Yoshida, S., Tanigawa, O., Moh, Y., Masuda, K., Wada, T., Suzuki, S., Nanamiya, H., Tozawa, Y., and Kawamura, F. Transcription activity of individual rrn operons in *Bacillus subtilis* mutants deficient in (p)ppGpp synthetase genes, *relA*, *yjbm*, and *ywaC*. *J. Bacteriol.*, **191**, 4555-4561 (2009).
- ④ Ochi, K., Kim, J-Y., Tanaka, Y., Wang, G., Masuda, K., Nanamiya, H., Okamoto, S., Tokuyama, S., Adachi, Y., and Kawamura, F. Inactivation of KsgA, a 16S rRNA methyltransferase, causes vigorous emergence of mutants with high-level kasugamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 193-201 (2009).
- ⑤ Nanamiya H., Kasai K., Nozawa A., Yun C.-S., Narisawa T., Murakami K., Natori Y., Kawamura F., and Tozawa Y. Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **67**, 291-304 (2008).
- ⑥ Natori, Y., Nanamiya, H., Akanuma, G., Kosono, S., Kudo, T., Ochi, K., and Kawamura, F. A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **63**, 294-307 (2007).
- ⑦ Soma A., Onodera A., Sugahara J., Kanai A., Yachie N., Tomita M., Kawamura F., and Sekine Y. Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science* **318**, 450-453 (2007)
- ⑧ Morohashi M., Ohashi ., Tani S., Ishii K., Itaya M., Nanamiya H., Kawamura F., Tomita M., and Soga T. Model-based definition of population heterogeneity and its effects on metabolism in sporulating *Bacillus*

- subtilis*. *J. Biochem.* **142**, 183-191 (2007)
- ⑨ Nishimura K., Johansen S. K., Inaoka T., Hosaka T., Tokuyama S., Tahara Y., Okamaoto S., Kawamura F., Douthwaite S., and Ochi K. Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *J. Bacteriol.* **189**, 6068-6073 (2007)
- ⑩ Asai, K., Inaoka, T., Nanamiya, H., Sadaie, Y., Ochi, K., and Kawamura, F., Isolation and characterization of sporulation-initiation mutation in the *Bacillus subtilis* *prfB* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 397-406, (2007).

[学会発表] (計22件)

- ① 和田哲也、枯草菌の正常な増殖と孢子形成に必要なrRNAオペロンのコピー数評価、2010年度日本農芸化学会、東京、2010年3月29日
- ② 鈴木祥太、枯草菌16SrRNAにおけるHelix 10領域の改変株の構築とその解析、2010年度日本農芸化学会、東京、2010年3月30日
- ③ 増田健太、単一rRNA保有株における増殖と孢子形成の阻害は、rRNAオペロンの重複によりサプレスされる、2010年度日本農芸化学会、東京、2010年3月30日
- ④ 田上和美、枯草菌新規ppGpp合成酵素YwaCによるリボソームの二量体化機構の解析、2010年度日本農芸化学会、東京、2010年3月30日
- ⑤ 増田健太、枯草菌における増殖・孢子形成が低下したrRNAオペロン多重欠失変異株から単離された遺伝子重複を伴うサプレッサー解析、日本遺伝学会第81回大会、松本、2009年9月17日
- ⑥ 田上和美、枯草菌における新規ppGpp合成酵素YwaCの生体内機能とリボソームの二量体化機構の解析、日本遺伝学会第81回大会、松本、2009年9月17日
- ⑦ 増田健太、枯草菌における増殖・孢子形成が低下したrRNAオペロン多重欠失変異株から単離された遺伝子重複を伴うサプレッサー解析、日本遺伝学会第81回大会、松本、2009年9月17日
- ⑧ 田上和美、枯草菌における新規ppGpp合成酵素YwaCの生体内機能とリボソームの二量体化機構の解析、日本遺伝学会第81回大会、松本、2009年9月17日
- ⑨ Wada Tetsuya. Isolation and characterization of suppressor mutants of the strains carrying a single copy of rRNA operon in *Bacillus subtilis*. 5th International Conference on Gram-positive Microorganisms. 2009年6月16日、アメリカ、サンディエゴ
- ⑩ Suzuki Shota. Isolation and characterization of various rRNA gene mutants including antibiotic resistance mutants in *Bacillus subtilis*. 5th International Conference on Gram-positive Microorganisms. 2009年6月16日、アメリカ、サンディエゴ
- ⑪ 和田哲也、枯草菌における単一rRNAオペロン保有株のサプレッサーメカニズムの解析、2009年度日本農芸化学会、福岡、2009年3月29日
- ⑫ 鈴木祥太、枯草菌rRNAオペロンの多コピー化に関する研究、2009年度日本農芸化学会、福岡、2009年3月29日
- ⑬ 田上和美、枯草菌における新規ppGpp合成酵素YwaCによるダイマールリボソーム形成の解析、2009年度日本農芸化学会、福岡、2009年3月29日
- ⑭ 谷川蔵、枯草菌リボソームタンパク質L2に関する温度感受性変異株のサプレッサー因子 *yaaA* 遺伝子の機能解析、2009年度日本農芸化学会、福岡、2009年3月29日
- ⑮ 田上和美、枯草菌における新規ppGpp合成酵素YwaCの機能解析、日本遺伝学会第80回大会、2008年9月5日、名古屋
- ⑯ 増田健太、枯草菌単一rRNAオペロン保有株からの細胞増殖・孢子形成能の回復したサプレッサーの単離と解析、日本遺伝学会第80回大会、名古屋、2008年9月5日
- ⑰ 谷川蔵、枯草菌におけるリボソームタンパク質L2をコードする *rplB* 遺伝子の温度感受性変異株とそのサプレッサー変異株の機能解析、日本遺伝学会第80回大会、名古屋、2008年9月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 富士夫 (KAWAMURA FUJIO)
立教大学・理学部・教授
研究者番号：10126039

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし